

PCT

ORGANISATION MONDIALE DE LA PROPRIÉTÉ INTELLECTUELLE
Bureau international

DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁶ : C12N 15/12, C07K 14/47, A61K 39/395, C12Q 1/68, A61K 38/17, G01N 33/53	A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 96/16169 (43) Date de publication internationale: 30 mai 1996 (30.05.96)
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR95/01539 (22) Date de dépôt international: 22 novembre 1995 (22.11.95) (30) Données relatives à la priorité: 94/13955 22 novembre 1994 (22.11.94) FR 95/05753 16 mai 1995 (16.05.95) FR (71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): RHÔNE-POULENC RORER S.A. [FR/FR]; 20, avenue Raymond-Aron, F-92165 Antony Cédex (FR). (72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement): DUCHESNE, Marc [FR/FR]; 71, rue du Général-de-Laminat, F-94370 Sucy-en-Brie (FR). FAUCHER, Didier [FR/FR]; 180, avenue de Choisy, F-75013 Paris (FR). PARKER, Fabienne [FR/FR]; 27, rue de la Fonte-des-Godets, F-92160 Antony (FR). SCHWEIGHOFFER, Fabien [FR/FR]; 53, boulevard de la Liberation, F-94300 Vincennes (FR). TOCQUE, Bruno [FR/FR]; 58, boulevard Saint-Denis, F-92400 Courbevoie (FR). (74) Mandataire: LE COUPANEC, Pascale; Rhône-Poulenc Rorer S.A., Direction des Brevets, 20, avenue Raymond-Aron, F-92160 Antony (FR).	(81) Etats désignés: AM, AU, BB, BG, BR, BY, CA, CN, CZ, EE, FI, GE, HU, IS, JP, KG, KP, KR, KZ, LK, LR, LT, LV, MD, MG, MN, MX, NO, NZ, PL, RO, RU, SG, SI, SK, TJ, TM, TT, UA, UG, US, UZ, VN, brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG). Publiée <i>Avec rapports de recherche internationale.</i> <i>Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si de telles modifications sont reçues.</i>	
(54) Title: PEPTIDES CAPABLE OF BINDING TO THE GAP PROTEIN SH3 DOMAIN, NUCLEOTIDE SEQUENCES CODING THEREFOR, AND PREPARATION AND USE THEREOF (54) Titre: PEPTIDES CAPABLES DE SE LIER AU DOMAINE SH3 DE LA PROTEINE GAP, SEQUENCES NUCLEOTIDIQUES CODANT POUR CES PEPTIDES, LEUR PREPARATION ET UTILISATION (57) Abstract Peptides capable of interacting with the GAP protein SH3 domain, nucleic acid sequences coding therefor, and pharmaceutical compositions containing same, are disclosed. (57) Abrégé La présente invention se rapporte à des peptides capables d'interagir avec le domaine SH3 de la protéine GAP et aux séquences d'acides nucléiques codant pour ces peptides. Elle concerne également les compositions pharmaceutiques les contenant.		

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Autriche	GB	Royaume-Uni	MR	Mauritanie
AU	Australie	GE	Géorgie	MW	Malawi
BB	Barbade	GN	Guinée	NE	Niger
BE	Belgique	GR	Grèce	NL	Pays-Bas
BF	Burkina Faso	HU	Hongrie	NO	Norvège
BG	Bulgarie	IE	Irlande	NZ	Nouvelle-Zélande
BJ	Bénin	IT	Italie	PL	Pologne
BR	Brsil	JP	Japon	PT	Portugal
BY	Bélarus	KE	Kenya	RO	Roumanie
CA	Canada	KG	Kirghizistan	RU	Fédération de Russie
CF	République centrafricaine	KP	République populaire démocratique de Corée	SD	Soudan
CG	Congo	KR	République de Corée	SE	Suède
CH	Suisse	KZ	Kazakhstan	SI	Sllovénie
CI	Côte d'Ivoire	LI	Liechtenstein	SK	Slovaquie
CM	Cameroun	LK	Sri Lanka	SN	Sénégal
CN	Chine	LU	Luxembourg	TD	Tchad
CS	Tchécoslovaquie	LV	Lettonie	TG	Togo
CZ	République tchèque	MC	Monaco	TJ	Tadjikistan
DE	Allemagne	MD	République de Moldova	TT	Trinité-et-Tobago
DK	Danemark	MG	Madagascar	UA	Ukraine
ES	Espagne	ML	Mali	US	Etats-Unis d'Amérique
FI	Finlande	MN	Mongolie	UZ	Ouzbékistan
FR	France			VN	Viet Nam
GA	Gabon				

PEPTIDES CAPABLES DE SE LIER AU DOMAINE SH3 DE LA PROTEINE GAP
SEQUENCES NUCLEOTIDIQUES CODANT POUR CES PEPTIDES
LEUR PREPARATION ET UTILISATION

La présente invention concerne de nouvelles séquences peptidiques et
5 nucléotidiques, et leur utilisation pharmaceutique. Plus particulièrement, l'invention
concerne des peptides capables de se lier au domaine SH3 de la protéine GAP.

Les produits des gènes ras, généralement désignés protéines p21, jouent un
rôle clé dans le contrôle de la division cellulaire chez tous les organismes eucaryotes
10 où ils ont été recherchés. Certaines modifications spécifiques de ces protéines leur font
perdre leur contrôle normal et les conduisent à devenir oncogéniques. Ainsi, un grand
nombre de tumeurs humaines ont été associées à la présence de gènes ras modifiés. De
même, une surexpression de ces protéines p21 peut conduire à un dérèglement de la
prolifération cellulaire. Globalement, les protéines p21 sont impliquées dans 30% des
15 cancers humains.

La compréhension du rôle exact de ces protéines p21 constitue donc un des
objectifs cibles de la recherche dans le domaine de l'oncologie.

Le modèle dont on dispose actuellement pour expliquer le fonctionnement des
protéines p21 repose sur des analogies qu'elles partagent avec les protéines G de
20 transduction. Il existe dans les cellules un équilibre entre les protéines p21 actives,
liées à du GTP et les formes inactives, ayant fixé du GDP. Dans une cellule quiescente,
où les p21 ne sont pas sollicitées, la majorité d'entre elles sont sous forme GDP.
Lorsque la cellule est stimulée, le facteur d'échange des nucléotides, GEF, devient plus
actif et facilite l'évacuation du GDP et son remplacement par du GTP. La protéine
25 adopte alors une conformation active qui lui permet de reconnaître et de stimuler son
effecteur, la protéine GAP "GTPase activating protein", vraisemblablement associée à
d'autres protéines. Le complexe p21-GTP-GAP interagit vraisemblablement à son tour
avec une ou d'autres protéine(s) permettant ainsi la transmission du signal qui entraîne
une réponse biologique de la cellule. L'association de p21-GTP avec GAP déclenche
30 simultanément l'hydrolyse du GTP et le retour de la p21 vers la forme inactive.

Dans le cas des protéines p21 oncogènes, la mutation qu'elles portent empêche
le retour à l'état inactif. L'équilibre est dans ce dernier cas, déplacé vers la forme active
de p21.

Cet équilibre complexe entre les formes active et inactive de p21 est contrôlé à
35 la fois par des facteurs inhérents aux propriétés biochimiques des protéines p21

(affinité relative pour le GDP et le GTP, vitesse d'échange des nucléotides ...) et des facteurs externes modulant leur activité comme notamment la protéine GAP.

La protéine GAP est une protéine cytosolique présente chez tous les organismes eucaryotes qui possède donc la faculté d'accélérer fortement l'hydrolyse du GTP, lié à la protéine p21 normale (Trahey et McCormick 1987). Elle possède deux domaines assurant des fonctions distinctes. Son extrémité carboxy-terminale porte l'activité catalytique qui fixe les protéines p21 et augmente leur activité GTPase. Sur son autre extrémité, en aval de la partie aminoterminal, se trouve une juxtaposition de domaines SH2 et SH3 qui sont susceptibles de participer à des interactions avec d'autres protéines.

A l'heure actuelle, on connaît deux protéines interagissant avec la protéine GAP. Il s'agit des protéines dénommées p62 et p190, respectivement de 62kDa et 190kDa. Ces deux protéines étant immunoprécipitées par des anticorps dirigés contre différents épitopes de GAP, forment à l'évidence un complexe spécifique avec GAP. On sait en particulier que c'est au niveau de la région SH2 que se fait l'interaction de la protéine p62 avec la protéine GAP.

En ce qui concerne plus particulièrement le domaine SH3, sa présence dans diverses protéines comme les phospholipases $C\gamma$ (PLC- γ), la sous unité p85 de la phosphatidylinositol-3 kinase et la protéine grb-2, toutes impliquées au niveau de la transduction du signal p21-Ras, laisse à penser que ce domaine est tout particulièrement important pour diriger les interactions protéine-protéine et donc nécessaire au fonctionnement de la protéine correspondante et/ou à sa localisation cellulaire. Dans le cas particulier de la protéine GAP, ce domaine SH3 pourrait donc également participer à la transduction du signal Ras. Il est clair que la compréhension du rôle exact de ce domaine SH3 serait particulièrement précieux sur le plan thérapeutique.

La présente invention a précisément pour objectif de contribuer à l'élucidation de la contribution du domaine SH3 à la transduction du signal ras.

La demanderesse a ainsi mis en évidence l'existence de protéines capables de s'associer à la protéine GAP via une liaison directe à son domaine SH3.

Plus précisément, la présente invention résulte de l'identification, l'isolement et la caractérisation de protéines capables d'interagir avec le domaine SH3 de la protéine GAP. Elle résulte également de la caractérisation structurale de ces protéines par identification de séquences peptidiques correspondantes.

Plus particulièrement, le polypeptide de l'invention, capable d'interagir avec le domaine SH3 de la protéine GAP, comprend tout ou partie d'une séquence peptidique choisie parmi les séquences SEQ ID N°1, SEQ ID N°2, SEQ ID N°3, SEQ ID N°4, 5 SEQ ID N°5 et SEQ ID N°9 ou d'un dérivé de celles-ci.

Au sens de la présente invention, le terme dérivé désigne toute molécule obtenue par modification de nature génétique et/ou chimique du polypeptide selon l'invention et conservant l'activité recherchée. Par modification de nature génétique 10 et/ou chimique, on doit entendre toute mutation, substitution, délétion, addition et/ou modification d'un ou plusieurs résidus. De tels dérivés peuvent être générés dans des buts différents, tels que notamment celui d'augmenter l'affinité du peptide pour son site d'interaction, celui d'améliorer ses niveaux de production, celui d'augmenter sa résistance à des protéases, celui d'augmenter son efficacité thérapeutique ou de réduire 15 ses effets secondaires, ou celui de lui conférer de nouvelles propriétés pharmacocinétiques et/ou biologiques.

Il peut également s'agir de fragments des séquences précitées de dérivés de celles-ci. De tels fragments peuvent être générés de différentes façons. En particulier, ils peuvent être synthétisés par voie chimique, sur la base de la séquence donnée dans 20 la figure 1, en utilisant les synthétiseurs peptidiques connus de l'homme du métier. Ils peuvent également être synthétisés par voie génétique, par expression dans un hôte cellulaire d'une séquence nucléotidique codant pour le peptide recherché. Dans ce cas, la séquence nucléotidique peut être préparée chimiquement en utilisant un synthétiseur d'oligonucléotides, sur la base de la séquence peptidique donnée dans la présente 25 demande et du code génétique. La séquence nucléotidique peut également être préparée à partir de la séquence donnée dans la présente demande, par coupures enzymatiques, ligature, clonage, etc, selon les techniques connues de l'homme du métier, ou par criblage de banques d'ADN avec des sondes élaborées à partir de la SEQ ID N°1.

30 Selon un mode particulier de l'invention, le polypeptide revendiqué comprend la SEQ ID N°1, SEQ ID N°2, SEQ ID N°3 et/ou SEQ ID N°4.

De préférence, le polypeptide selon l'invention possède un poids moléculaire de l'ordre de 68kDa.

Selon un mode particulier de l'invention, il s'agit d'un polypeptide d'origine humaine comprenant tout ou partie de la SEQ ID N°5, de la SEQ ID N°9 ou de l'un de leurs dérivés tels que définis précédemment.

Il s'agit plus particulièrement d'un polypeptide comprenant la SEQ ID N°5.

5

Plus préférentiellement, il s'agit d'un polypeptide représenté en SEQ ID N°9 ou de l'un de ses dérivés.

De manière inattendue, cette protéine ne possède pas d'homologie avec une autre protéine p68 déjà identifiée comme se liant au domaine SH3 de Src. Elle n'est pas phosphorylée au niveau de ses motifs tyrosine dans les cellules en croissance ou à l'état de mitose.

L'analyse de la séquence protéique ID N°9 révèle que la protéine associée au domaine SR+H3 de la protéine GAP, désignée G3BP, appartient à la famille des hnRNP (heterogenous nuclear RiboNucleoProteins). Plus précisément G3BP est une protéine de 466 A.a, présentant un poids moléculaire apparent de 68 kDa qui contient plusieurs domaines caractéristiques des protéines qui se lient aux ARN :

- des domaines RNP2 et RNP1 (A.a 342 à 347)
- 4 RGG box (A.a 435 à 449)
- un domaine auxiliaire acide (A.a 144 à 221).

L'invention s'étend également aux peptides capables d'antagoniser l'interaction entre la G3BP et le domaine SH3 de GAP. L'activité de ces peptides peut être mise en évidence dans des tests de compétition (cf exemple 2-3) ou d'interférence des signaux transduits par les protéines Ras.

25

Un autre objet de l'invention réside dans des anticorps ou fragments d'anticorps polyclonaux ou monoclonaux dirigés contre un polypeptide tel que défini ci-avant. De tels anticorps peuvent être générés par des méthodes connues de l'homme du métier. En particulier, ces anticorps peuvent être préparés par immunisation d'un animal contre un polypeptide dont la séquence est choisie parmi les SEQ ID N°1, SEQ ID N°2, SEQ ID N°3, SEQ ID N°4, SEQ ID N°5 et la SEQ ID N°9 ou tout fragment

30

ou dérivé de celles-ci, prélèvement du sang et isolement des anticorps. Ces anticorps peuvent également être générés par préparation d'hybridomes selon les techniques connues de l'homme de l'art.

Les anticorps ou fragments d'anticorps de l'invention peuvent ainsi être
5 utilisés pour réguler l'état d'activation du produit des gènes ras.

Par ailleurs, ces anticorps peuvent également être utilisés pour détecter et/ou doser un peptide selon l'invention dans des échantillons biologiques, et de ce fait, pour renseigner sur l'état d'activation du produit des gènes ras.

L'invention s'étend également aux antagonistes à savoir tout peptide capable
10 de bloquer l'interaction d'un polypeptide selon l'invention avec le domaine SH3 de la protéine GAP. De tels peptides peuvent être mis en évidence dans des tests de compétition (cf exemple 2-3) ou d'inhibition de l'activité ras.

La présente invention permet donc de générer des polypeptides dérivés des séquences identifiées ci-dessus ainsi que des anticorps dirigés contre ces polypeptides
15 ou des protéines correspondantes, présentant des propriétés biologiques intéressantes en vue d'une utilisation pharmaceutique.

L'invention fournit également des composés non peptidiques ou non exclusivement peptidiques utilisables pharmaceutiquement. Il est en effet possible, à partir des motifs protéiques actifs décrits dans la présente demande, de réaliser des
20 molécules inhibitrices de la voie de signalisation dépendante des protéines P21 non exclusivement peptidiques et compatibles avec une utilisation pharmaceutique. A cet égard, l'invention concerne l'utilisation d'un polypeptide de l'invention tel que décrit ci-avant pour la préparation de molécules non-peptidiques, ou non exclusivement peptidiques, actives pharmacologiquement, par détermination des éléments
25 structuraux de ce polypeptide qui sont importants pour son activité et reproduction de ces éléments par des structures non-peptidiques ou non exclusivement peptidiques. L'invention a aussi pour objet des compositions pharmaceutiques comprenant une ou plusieurs molécules ainsi préparées.

La présente invention a également pour objet toute séquence d'acide
30 nucléique codant pour un polypeptide capable de se lier au domaine SH3 de la protéine GAP. Plus préférentiellement, il s'agit d'une séquence comprenant :

(a) tout ou partie de la SEQ ID N°6, SEQ ID N°10 ou d'un de leurs brins complémentaires,

(b) toute séquence hybridant avec la séquence (a) et codant pour un
35 polypeptide selon l'invention, et

(c) les séquences dérivées des séquences (a) et (b) en raison de la dégénérescence du code génétique.

De préférence, elle comprend la séquence SEQ ID N°6 et plus
5 préférentiellement est représentée par LA SEQ ID N°10.

Les différentes séquences nucléotidiques de l'invention peuvent être d'origine artificielle ou non. Il peut s'agir de séquences génomiques, d'ADNc, d'ARN, de séquences hybrides ou de séquences synthétiques ou semi-synthétiques. Ces séquences peuvent être obtenues par exemple par criblage de banques d'ADN (banque d'ADNc,
10 banque d'ADN génomique) au moyen de sondes élaborées sur la base de séquences présentées ci-avant. De telles banques peuvent être préparées à partir de cellules de différentes origines par des techniques classiques de biologie moléculaires connues de l'homme du métier. Les séquences nucléotidiques de l'invention peuvent également être préparées par synthèse chimique, notamment selon la méthode des phosphoramidites,
15 ou encore par des méthodes mixtes incluant la modification chimique ou enzymatique de séquences obtenues par criblage de banques.

Ces séquences nucléotidiques selon l'invention sont utilisables dans le domaine pharmaceutique, soit pour la production des polypeptides de l'invention, soit pour la réalisation de séquences antisens utilisables dans le cadre d'une thérapie
20 génique, soit encore pour la détection et le diagnostic, par des expériences d'hybridation, de l'activité de la protéine GAP dans des échantillons biologiques ou pour l'isolement de séquences homologues à partir d'autres sources cellulaires.

Pour la production des polypeptides de l'invention, les séquences nucléiques définies ci-dessus sont généralement placées sous le contrôle de signaux permettant leur expression dans un hôte cellulaire. Le choix de ces signaux (promoteurs, terminateurs, sequence "leader" de sécrétion, etc) peut varier en fonction de l'hôte cellulaire utilisé. Préférentiellement, ces séquences nucléotidiques de l'invention font partie d'un vecteur, qui peut être à répllication autonome ou intégratif. Plus
25 particulièrement, des vecteurs à répllication autonome peuvent être préparés en utilisant des séquences à répllication autonome chez l'hôte choisi. S'agissant des vecteurs intégratifs, ceux-ci peuvent être préparés par exemple en utilisant des séquences homologues à certaines régions du génome de l'hôte, permettant, par recombinaison homologue, l'intégration du vecteur.
30

Les hôtes cellulaires utilisables pour la production des polypeptides de l'invention sont aussi bien des hôtes eucaryotes que procaryotes. Parmi les hôtes eucaryotes qui conviennent, on peut citer les cellules animales, les levures, ou les champignons. En particulier, s'agissant de levures, on peut citer les levures du genre
5 *Saccharomyces*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Schwanniomyces*, ou *Hansenula*. S'agissant de cellules animales, on peut citer les cellules COS, CHO, Cl27, etc. Parmi les champignons, on peut citer plus particulièrement *Aspergillus* ssp. ou *Trichoderma* ssp. Comme hôtes procaryotes, on préfère utiliser les bactéries suivantes *E.coli*, *Bacillus*, ou *Streptomyces*.

10 Les séquences d'acides nucléiques selon l'invention peuvent également servir à la réalisation d'acides nucléiques antisens utilisables comme agents pharmaceutiques. L'inhibition de l'expression de certains oncogènes par des acides nucléiques antisens s'est avérée être une stratégie utile dans la compréhension du rôle de ces oncogènes et une voie particulièrement prometteuse dans la réalisation d'un traitement
15 anticancéreux. Les oligonucléotides antisens sont des oligonucléotides de petite taille, complémentaires du brin codant d'un gène donné, et de ce fait capables d'hybrider spécifiquement avec l'ARNm transcrit, inhibant sa traduction en protéine. De tels oligonucléotides peuvent être constitués par tout ou partie des séquences nucléiques définies ci-avant. Il s'agit généralement de séquences ou de fragments de séquences
20 complémentaires de séquences codant pour des peptides selon l'invention. De tels oligonucléotides peuvent être obtenus à partir des séquences précitées, par fragmentation, etc, ou par synthèse chimique.

L'invention concerne également, comme séquences nucléotidiques, les sondes nucléotidiques, synthétiques ou non, capables de s'hybrider avec les séquences
25 nucléotidiques définies ci-avant qui codent pour un polypeptide de l'invention, ou avec l'ARNm correspondant. De telles sondes peuvent être utilisées in vitro comme outil de diagnostic. De telles sondes doivent être préalablement marquées, et pour cela différentes techniques sont connues de l'homme du métier. Les conditions d'hybridation dans lesquelles ces sondes peuvent être utilisées sont les conditions
30 normales de stringence. Ces sondes peuvent également être utilisées pour la mise en évidence et l'isolement de séquences d'acides nucléiques homologues codant pour un polypeptide de l'invention, à partir d'autres sources cellulaires. A titre illustratif de ces sondes, on peut plus particulièrement mentionner les sondes représentées par les SEQ ID N°7 et SEQ ID N°8, qui sont utilisées en exemple 3 ci-après.

L'invention a encore pour objet toute composition pharmaceutique comprenant comme principe actif au moins un polypeptide tel que défini ci-avant.

- 5 Elle a aussi pour objet toute composition pharmaceutique comprenant comme principe actif au moins un anticorps et/ou un fragment d'anticorps tel que défini ci-avant, ainsi que toute composition pharmaceutique comprenant comme principe actif au moins un oligonucléotide antisens tel que défini ci-avant.

Par ailleurs, elle a aussi pour objet les compositions pharmaceutiques dans lesquelles les polypeptides, anticorps et oligonucléotides antisens définis ci-avant sont associés entre-eux ou avec d'autres principes actifs.

- 10 Les compositions pharmaceutiques selon l'invention peuvent être utilisées pour moduler l'activation des protéines p21 et de ce fait pour moduler la prolifération de certains types cellulaires. Plus particulièrement, ces compositions pharmaceutiques sont destinées au traitement de cancers. De nombreux cancers ont en effet été associés à la présence de protéines ras oncogéniques. Parmi les cancers renfermant le plus
15 souvent des gènes ras mutés, on peut citer notamment les adénocarcinomes du pancréas, dont 90% ont un oncogène Ki-ras muté sur le douzième codon (Almoguera et coll., Cell 53 (1988) 549), les adénocarcinomes du colon et les cancers de la thyroïde (50%), ou les carcinomes du poumon et les leucémies myéloïdes (30%, Bos, J.L. Cancer Res. 49 (1989) 4682).

- 20 L'invention a encore pour objet l'utilisation des molécules décrites ci-avant pour moduler voire inhiber l'activité des protéines p21. En particulier, l'invention a pour objet l'utilisation de tout ou fragment de G3BP pour interférer avec les signaux transduits par les produits des gènes Ras. Les fragments protéiques homologues aux hnRNP sont utilisés avantageusement pour inhiber la liaison de G3BP avec ses ARN
25 cibles. Des séquences identiques ou complémentaires à ces ARN cibles peuvent être également utilisées pour interférer avec les signaux transduits par la protéine G3BP.

- L'invention fournit également un procédé de détection de l'expression et/ou d'une surexpression de la protéine G3BP dans un échantillon biologique. Un tel procédé comprend par exemple la mise en contact d'un tel échantillon avec un
30 anticorps ou fragment d'anticorps selon l'invention, la révélation des complexes antigène-anticorps, et la comparaison des résultats obtenus avec un échantillon standard. Dans un tel procédé, l'anticorps peut être en suspension ou préalablement immobilisé sur un support. Ce procédé peut également comprendre la mise en contact de l'échantillon avec une sonde nucléotidique selon l'invention, la mise en évidence des

hybrides obtenus, et la comparaison avec ceux obtenus dans le cas d'un échantillon standard.

La présente invention peut être utilisée à plusieurs titres dans le domaine thérapeutique : les polypeptides, anticorps et séquences nucléotidiques de l'invention étant capables de moduler l'activité des gènes ras, ils permettent en effet d'intervenir dans le processus de développement des cancers. En raison de leur forte expression dans les cellules de muscles striés squelettique, ces peptides interviennent en outre vraisemblablement dans les pathologies liées à un défaut de signalisation comme le diabète par exemple. Un autre aspect de l'invention consiste à utiliser des séquences nucléotidiques ADN ou ARN capables d'interagir avec les polypeptides revendiqués. Ces séquences peuvent être préparées selon la méthode décrite dans la demande internationale WO 91/19813.

L'invention peut également être utilisée dans le domaine du diagnostic et du typage de cancers.

D'autres avantages de la présente invention apparaîtront à la lecture des exemples et figures qui suivent, qui doivent être considérés comme illustratifs et non limitatifs.

FIGURES:

Figure 1: Effet d'une surexpression de G3BP dans des fibroblastes NIH 3T3 sur l'activité CAT.

Figure 2: Effet d'une surexpression de G3BP dans des fibroblastes NIH 3T3 sur la formation de foyers induite par les oncogènes Src et Ras .

MATERIEL ET METHODES

Techniques générales de clonage

Les méthodes classiquement utilisées en biologie moléculaire telles que les extractions préparatives d'ADN plasmidique, la centrifugation d'ADN plasmidique en gradient de chlorure de césium, l'électrophorèse sur gels d'agarose ou d'acrylamide, la purification de fragments d'ADN par électroélution, les extractions de protéines au

phénol ou au phénol-chloroforme, la précipitation d'ADN en milieu salin par de l'éthanol ou de l'isopropanol, la transformation dans *Escherichia coli*, etc, sont bien connues de l'homme de métier et sont abondamment décrites dans la littérature [Maniatis T. et al., "Molecular Cloning, a Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y., 1982; Ausubel F.M. et al. (eds), "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley & Sons, New York, 1987].

Les enzymes de restriction ont été fournies par New England Biolabs (Biolabs), Bethesda Research Laboratories (BRL) ou Amersham et sont utilisées selon les recommandations des fournisseurs.

10 Le plasmide pGEX 2T est d'origine commerciale.

L'amplification enzymatique de fragments d'ADN par la technique dite de PCR [Polymérase-catalyzed Chain Reaction, Saiki R.K. et al., Science 230 (1985) 1350-1354; Mullis K.B. et Faloona F.A., Meth. Enzym. 155 (1987) 335-350] est effectuée en utilisant un "DNA thermal cycler" (Perkin Elmer Cetus) selon les spécifications du fabricant.

15 La vérification des séquences nucléotidiques est effectuée par la méthode développée par Sanger et al. [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74 (1977) 5463-5467] en utilisant le kit distribué par Amersham.

Pour les expériences d'hybridation, les conditions de stringence normales sont généralement les suivantes : hybridation : 3 x SCC en présence de 5 x Denhart's à 65°C; lavage : 0,5 x SSC à 65 °C.

EXEMPLE 1

Préparation des protéines de fusion Glutathion-S-transférase SH3

25

Les séquences d'ADN codant pour les domaines SH3 des protéines GAP (résidus 275 à 350) et c-Src (résidus 84 à 148) sont amplifiées par la technique de P.C.R. et clonées dans un vecteur d'expression pGEX2T entre les sites de restriction Bam HI et ECORI. Les bactéries ainsi transformées sont cultivées, induites avec du IPTG (1-thio-β-D galactopyranoside) et lysées par sonication. Les protéines de fusion GST SH3 sont purifiées par chromatographie d'affinité sur billes d'agarose glutathion (Pharmacia LKB biotech) puis éluées avec 10mM de glutathion réduit.

30

35 EXEMPLE 2

1) Préparation des lysats cellulaires

Des cellules ER22 (fibroblastes de hamster surexprimant le récepteur EGF humain) ou des cellules NIH 3T3 exprimant pp60 C-Src(F-527) sont cultivées sur milieu DMEM (Dabelcco's Modified Eagle Medium) enrichi avec 10% de sérum de veau foetal contenant l'antibiotique G418 (200µg/ml) et 2mM/l de glutamine (5GBICO-BRL), à 37°C sous 5% en CO₂.

Dans chaque essais, les cellules ER22 sont cultivées dans des boîtes de 100mm jusqu'à confluence puis sans sérum pendant 18heures. De l'orthovanadate de sodium est ajouté à une concentration finale de 100µM et l'incubation poursuivie pendant 30 minutes. L'EGF est ensuite ajouté directement au milieu pour une concentration finale de 80nM en 10 minutes et à 37°C.

Pour certains essais, les cellules mitotiques sont récupérées par traitement avec 0,4µg de nocodazole (SIGMA) par ml pendant 18heures. Elles sont rapidement lavées avec un tampon salin à base de phosphate, refroidi dans la glace, puis solubilisées en 30 minutes à 4°C dans 1 ml de tampon de lyse, HNTG (50 mM d'Hepès, pH 7,5, 150 mM de NaCl, 1% de Triton x 100, 10% de Glycérol, 1 mM de MgCl₂, 1 mM d'EGTA, en présence d'inhibiteurs de phosphatases (1 mM de Na₃VO₄, 10 mM de Na₄P₂O₇, 10 mM de NaF) et d'inhibiteurs de protéases (1 µg/ml de leupeptine, 1 µg/ml d'inhibiteur de trypsine, 1 µg/ml de pepstatine A, 2 µg/ml d'aprotinine, 10 µg/ml de benzamidine, 1 mM de phénylméthanesulfonyle fluorure, 1 µg/ml µg/ml d'antipain, 1 µg/ml de chymostatine).

Les lysats sont décantés par centrifugation à 15 000 tours/mn pendant 10 mn. La concentration en protéines est ensuite déterminée (Bio-rad micro-test).

2) Test de liaisons directes

L'ensemble des lysats cellulaires (200 µg) et des protéines immunoprécipitées sont séparés sur gel de polyacrylamide à 7,5% de dodécyl sulfate de sodium (SDS-PAGE) puis transférés sur une membrane de difluorure de polyvinylidène (PVDF Millipore Corpo.). La liaison non spécifique au niveau des filtres est bloquée par 2% de lait écrémé dans du PBS contenant 0,05% de Tween 20, pendant 2 heures, à température ambiante. Les filtres sont incubés avec la protéine GST et des protéines GST-SH3 dans le tampon bloquant pendant 12H à 4°C. Après avoir été lavées avec du PBS-

0,05% Tween 20, les protéines liées sont détectées par incubation successive avec un anticorps monoclonal anti-GST (0,25 µg/ml) (Hybridolab Pasteur Inst.), un anticorps anti-souris conjugué à une phosphatase alcaline et du sel 5 bromo-4 chloro-3 indolylphosphate toluidinium nitrobleu tetrazolium (PROMEGA).

5

3) Test de compétition

Des peptides synthétiques correspondant aux séquences (275-305), (299-326), (317-326), (320-350) de GAP SH3 ou à la séquence putative de la dynamine (RRAPAVPPARPGS) se liant au domaine SH3 sont synthétisés sur un appareil

10 Applied Biosystems 431 A, utilisant la chimie FMOC.

La protéine p68 purifiée est isolée par électrophorèse sur gel de polyacrylamide-dodécyl sulfate de sodium et transférée par électrophorèse sur membrane PVDF. Les membranes sont incubées avec des quantités croissantes en peptides. Le peptide Poly-L-proline (SIGMA) est utilisé à 500 µM dans une réaction témoin. Après 1 H d'incubation, la protéine GST-GAP-SH3 (2µg/ml) est ajouté à chaque milieu réactionnel. Les filtrats sont sondés avec un anticorps monoclonal anti-GST comme décrit précédemment.

20

4) Immunoprécipitation et immunotransfert

Les lysats cellulaires solubles (3 mg) sont décantés avec 50 µl de protéine A sépharose CL-4B (Pharmacia Biotech) pendant 2 H à 4 °C. Les lysats cellulaires décantés sont incubés avec l'anticorps monoclonal antiphosphotyrosine (anticorps monoclonal 4G10 - Upstate Biotechnology Incorporated) pendant 4 H à 4 °C. Puis, 50 µl de protéine A-Sépharose sont ajoutés au complexe et l'incubation est poursuivie toute une nuit à 4°C. Les immunoprécipités sont lavés 3 fois avec un tampon HNTG et solubilisés dans un échantillon de tampon SDS (100 µl). Les complexes sont ensuite séparés par SDS-PAGE et transférés par électrophorèse sur des membranes PVDF.

30

Les membranes sont incubées avec l'anticorps monoclonal phosphotyrosine dans du TBS (10 mM de Tris, pH 7,4, 150 mM de NaCl, 3% de sérum albumine bovin) et en outre incubées avec des seconds anticorps conjugués à une phosphatase alcaline. Des substrats pour la phosphatase alcaline sont ensuite ajoutés pour un développement approprié de la couleur.

35

5) Purification et analyse de la séquence

- Environ $5 \cdot 10^9$ cellules ER22 sont lysées dans 200 ml de tampon HNTG. Le lysat est centrifugé à 15 000 g pendant 15 min et dilué 5 fois dans un tampon HNG (50 mM d'Hepes, pH 7,5, 150 mM de NaCl, 10% de Glycérol, 1 mM d'EGTA, inhibiteurs de phosphatase et inhibiteurs de protéase). Le lysate est incubé toute une nuit avec 6 ml de S-Sépharose Fast flow équilibré dans le même tampon. Le complexe est transvasé sur colonne (2,5 x 1,3 cm - IBF). La colonne est lavée avec 10 fois son volume en tampon et les protéines liées sont ensuite éluées à une vitesse d'élution de 60 ml h⁻¹, avec un gradient linéaire de 60 ml de 0 à 1 M de NaCl du même tampon. Les fractions possédant l'activité de liaison déterminée dans les conditions de l'exemple 2.2 (0,15-0,37 M NaCl) sont rassemblées, diluées 10 fois dans un tampon HNG et chargées sur Héparine-Sépharose CL-6B (3ml) (Pharmacia LKB), prééquilibrée avec le même tampon à une vitesse d'élution de 24 ml h⁻¹. Après lavage avec le tampon HNG, la colonne est éluée avec un gradient de 24 ml, de 0 à 1 M de NaCl. Des fractions actives de la chromatographie S Fast Flow sont rassemblées, diluées 4 fois dans un tampon MES (100 mM de MES, pH 6,8, 1 mM de MgSO₄, 1 mM d'EGTA) et transférées sur une colonne ATP d'agarose (3 ml) (Sigma N° A9264) prééquilibrée avec le tampon MES contenant 50 mM de NaCl à un débit d'élution de 6 ml.h⁻¹. La colonne est ensuite lavée avec 20 ml de tampon MES contenant 50 mM de NaCl et éluée à 30 ml.h⁻¹ avec un gradient linéaire de 50 mM à 2 M NaCl dans le tampon MES. La protéine p68 élue entre 0.3 M et 0.4 M de NaCl. Les fractions actives sont rassemblées, dialysées avec 20 mM de NH₄HCO₃ pH 8,3 et concentrées. Les protéines amenées à sec, sont resuspendues dans un tampon SDS, séparées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide. Le gel est coloré avec du bleu de coomassie et la bande de poids moléculaire de 68kDA, correspondant à l'activité de liaison SH₃ est recueillie. Elle est lavée pendant 1 heure avec les solutions suivantes: eau, eau/méthanol (90/10), eau/CH₃CN (80/20), eau/CH₃CN (50/50).
- La bande de gel, contenant la protéine p68 purifiée, est ensuite divisée en petits fragments et séchée sous SPEED/VAC (SAVANT). On ajoute 400µl d'une solution contenant 25 mM Tris pH 8,5, 1 mM d'EDTA, 0,05% de SDS et 5µg d'endoprotéinase Lys-c (Boehringer Mannheim) et l'ensemble est incubé toute une nuit à 37°C. L'hydrolysate est injecté sur colonne HPLC en phase inverse (Vydac C18: 2,1 x 250mm). La colonne est éluée à 0,2ml/min avec un gradient linéaire de 0 à 35% B en

150 minutes. (A: H₂O + TFA 0,07% et B: CH₃CN + TFA 0,07%) et les pics d'élution observés à tr 113,7, 117,7 et 133,7 min sont recueillis et directement séquencés en utilisant un microséquenceur Applied Biosystems 477A. La séquence des peptides correspondants ainsi obtenus est présentée en SEQ ID N°1, SEQ ID N°2, SEQ ID N°3 et SEQ ID N°4. Ces séquences ne présentent aucune homologie avec des protéines référencées dans les bases de données de protéines (PIR 33. Swiss-Prot 33 (intelligenetics)).

10 Afin de déterminer si la protéine p68 est phosphorylée au niveau de la tyrosine dans les cellules mitotiques ou non synchrones, les protéines des lysats issus de cellules ER22 cultivées dans 10% de sérum de veau foétal ou de cellules traitées avec le nocodazole sont immunoprécipitées avec des anticorps anti-phosphotyrosine, transférées sur membrane et soit immunodétectées avec des anticorps anti-phosphotyrosine soit incubées avec soit GST-GAP-SH3 ou GST-Src-SH3, dans les conditions décrites en exemples 2.2 et 2.4.

15 Comme témoin, les protéines des cellules NIH 3T3, transformées avec un allèle activé de c-Src (c-Src Y527F) sont testées dans les mêmes conditions que celles décrites pour les protéines ER22. Les résultats obtenus montrent que des protéines sont phosphorylées au niveau de la tyrosine, plus particulièrement dans la région 60-70kDa.

20 Dans les cellules ER22 aucune liaison à une protéine phosphorylée p68 n'est détectée avec les sondes GST-GAP-SH3 ou GST-Src-SH3. Dans les cellules NIH3T3 (c-Src Y527F), la sonde GST-Src-SH3 se lie à une protéine de poids moléculaire de 68kDa phosphorylée en tyrosine alors que la sonde GST-GAP-SH3 n'interagit avec aucune protéine.

25 Afin de confirmer l'implication fonctionnelle de cette protéine dans la voie de signalisation ras, des expériences de compétition ont été réalisées dans les conditions décrites dans l'exemple 2.3. Les résultats obtenus montrent que les peptides dérivés de GAP capables de bloquer la rupture des vésicules germinales d'oeufs de xénope (GVBD) induite par ras, peptides (299-326) et (317-326) de GAPSH3 sont également capables de bloquer l'interaction entre la protéine G3BP et GAP.

30 Ces résultats confirment clairement que la capacité de bloquer l'activité de la protéine selon l'invention ou d'interférer avec son activité constitue une nouvelle approche particulièrement prometteuse pour le traitement du cancer.

35

EXEMPLE 3

Isolement de la séquence SEQ ID N°6 humaine à partir d'une banque d'ADNc de placenta humain.

5

On utilise à titre de sondes les SEQ ID N°7 et N°8, établies à partir des séquences peptidiques SEQ ID N°1 et SEQ ID N°3. L'ADN de la banque Clontech HL1008B a été préparé et utilisé dans une réaction de PCR. 30 cycles d'amplification ont été réalisés dans les conditions suivantes: dénaturation 1 min à 94°C, appariement 1 min entre 35 et 40°C et élongation 1 min à 72°C. Cette réaction permet d'isoler un fragment d'ADN de 1,3kb dont une partie de la séquence est donnée en SEQ ID N°6. Une analyse en Northern Blot montre que l'ARN correspondant (3,3kb) est ubiquitaire et exprimé très fortement dans le muscle squelettique adulte.

10

15 **EXEMPLE 4 :**

Isolement de la séquence SEQ ID N°10 codant pour la p68 humaine à partir d'une banque d'ADNc de placenta humain.

20

On utilise les deux oligonucléotides (SEQ ID N°7) et (SEQ ID N°8) comme amorces pour l'amplication d'un ADNc dans une banque de placenta humain. La P.C.R. a été réalisée grâce à l'Amplitaq Perkin Elmer à une température d'annealing de 35°C suivie d'1mn d'extension à 72°C en présence de 10 % de formamide. Nous avons amplifié un fragment d'ADNc de 1164pb. Après un clonage direct en vecteur pMOSblue (Amersham) comportant des séquences -20 et inverse, le fragment a été séquencé grâce à des sondes fluorescentes. Ce fragment PCR a ensuite été utilisé comme sonde pour screener 10⁶ phages d'une banque λgt11 d'ADNc de placenta humain (Clontech). La sonde a été synthétisée par le système Rediprime d'Amersham et les filtres ont été incubés 16 heures dans le tampon d'hybridation (6X SSC, 5X Denhardt's, 100 µg/ml sperme de saumon, 0,25 % SDS) contenant la sonde à 45°C. Les filtres ont ensuite été lavés 1 heure à température ambiante et 20 mn à température d'hybridation en 2X SSC, 0,05 % SDS. Huit clones positifs ont été identifiés. Deux d'entre eux ont été purifiés et les ADNc ont été digérés par EcoRI pour ressortir les inserts. Ils ont été sous-clonés en M13mp18/EcoRI pour être séquencés. Le séquençage a été réalisé sur les fragments issus d'une délétion progressive à l'exonucléase III de l'ADNc (Nested Deletion Kit, Pharmacia Biotech). Les différences de taille des fragments ont été

25

30

35

analysées par amplification PCR entre les amorces -20 et reverse du vecteur M13 et différentes populations de taille ont été choisies pour subir le séquençage. L'assemblage des différentes séquences obtenues a permis la reconstitution de la phase ouverte entière de la P68.

5

EXEMPLE 5

Surexpression de la G3BP dans des fibroblastes NIH 3T3

Des fibroblastes NIH 3T3 sont transfectés par un gène rapporteur, celui de la chloramphénicol acétyl transférase, placé sous contrôle d'éléments de réponse à Ras dérivés de l'enhancer du virus du polyôme. Ces éléments sont stimulés de 15 à 30 fois lorsque les cellules sont transfectées par un vecteur d'expression portant l'ADNc des oncogènes Src et Ras. Ces stimulations sont affectées lorsque la protéine G3BP est exprimée après cotransfection d'un vecteur d'expression contenant un ADNc qui correspond à la phase ouverte de la protéine. De façon dose-dépendant, la G3BP inhibe l'activité CAT stimulée par Src et par la forme oncogénique de Ras. Cette observation est représentée en figure 1.

De la même façon, l'expression de la protéine G3BP s'oppose à la formation de foyers induite par les oncogènes Src et Ras. La figure 2 rend compte de cette observation.

Ces expériences démontrent clairement la capacité de G3BP à s'opposer aux effets prolifératifs des signaux transduits par les protéines Ras normales ou oncogéniques.

LISTE DE SEQUENCES(1) INFORMATION GENERALE:

- 5 (i) DEPOSANT:
(A) NOM: RHONE-POULENC RORER S.A.
(B) RUE: 20, avenue Raymond ARON
(C) VILLE: ANTONY
(E) PAYS: FRANCE
10 (F) CODE POSTAL: 92165
- (ii) TITRE DE L'INVENTION: PEPTIDE CAPABLE DE SE LIER AU DOMAINE
SH3 DE LA PROTEINE GAP.
- 15 (iii) NOMBRE DE SEQUENCES:10
- (iv) FORME LISIBLE PAR ORDINATEUR:
(A) TYPE DE SUPPORT: Tape
(B) ORDINATEUR: IBM PC compatible
20 (C) SYSTEME D' EXPLOITATION: PC-DOS/MS-DOS
(D) LOGICIEL: PatentIn Release #1.0, Version #1.25 (OEB)

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 1:

- 25 (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
(A) LONGUEUR: 19 acides aminés
(B) TYPE: acide aminé
(D) CONFIGURATION: linéaire
- (ii) TYPE DE MOLECULE: Protéine
30 (vi) ORIGINE: HAMSTER
- (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 1:
- Val Met Glu Lys Pro Ser Pro Leu Leu Val Gly Arg Glu Phe Val Arg Gln
1 5 10 15
35 Tyr Ile

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 2:

- 40 (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
(A) LONGUEUR: 15 acides aminés
(B) TYPE: acide aminé
(D) CONFIGURATION: linéaire
- (ii) TYPE DE MOLECULE: Protéine
45 (vi) ORIGINE: HAMSTER
- (ix) FEATURE:
(D) OTHER INFORMATION: Le premier Xaa représente soit un
motif alanine ou thréonine et le second Xaa un acide aminé
50 quelconque.

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 2:

- Xaa Xaa Glu Gly Asp Asp Arg Asp Asn Arg Leu Leu Gly Pro
1 5 10 15
55

5 (2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 3:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 (A) LONGUEUR: 17 acides aminés
 (B) TYPE: acide aminé
 (D) CONFIGURATION: linéaire

- 10 (ii) TYPE DE MOLECULE: Protéine
 (vi) ORIGINE: HAMSTER

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 3:

15 Leu Pro Asn Phe Gly Phe Val Val Phe Asp Asp Ser Glu Pro Val
 1 5 10 15
 Gln Lys

20

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 4:

- 25 (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 (A) LONGUEUR: 19 acides aminés
 (B) TYPE: acide aminé
 (D) CONFIGURATION: linéaire

- (ii) TYPE DE MOLECULE: Protéine
 (vi) ORIGINE: HAMSTER

- 30 (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 4:

 Ser Ala Thr Pro Ala Pro Ala Asp Val Ala Pro Ala Gln Glu Asp Leu
 1 5 10 15
 35 Arg Xaa Phe

40

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 5:

- 45 (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 (A) LONGUEUR: 68 acides aminés
 (B) TYPE: acide aminé
 (D) CONFIGURATION: linéaire

- (ii) TYPE DE MOLECULE: Protéine
 (vi) ORIGINE: HUMAIN

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 5:

50 Arg Glu Ala Gly Glu Gln Gly Asp Ile Glu Pro Arg Arg Met Val Arg
 1 5 10 15

19

His Pro Asp Ser His Gln Leu Phe Ile Gly Asn Leu Pro His Glu Val
 20 25 30

5 Asp Lys Ser Glu Leu Lys Asp Phe Phe Gln Ser Tyr Gly Asn Val Val
 35 40 45

Glu Leu Arg Ile Asn Ser Gly Pro Lys Leu Pro Asn Phe Ala Phe Val
 50 55 60

10 Val Phe Asp Asp
 65

15

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 6:

(1) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:SEQ ID NO: 6:

- 20 (A) LONGUEUR:204 paires de bases
 (B) TYPE: acide nucléique
 (C) NOMBRE DE BRINS: double
 (D) CONFIGURATION: linéaire

25

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: NON

30

(vi) ORIGINE:

(A) ORGANISME: Humain

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 6:

35 CGTGAGGCTG GTGAGCAAGG TGACATTGAA CCCCAGAGAA TGGTGAGACA CCCTGACAGT 60
 CACCAACTCT TCATTGGCAA CCTGCCTCAT GAAGTGGACA AATCAGAGCT TAAAGATTTC 120
 TTCAAAAGTT ATGGAACGT GGTGGAGTTG CGCATTAAACA GTGGTGGGAA ATTACCCAAT 180
 TTCGCCTTCG TCGTCTTCGA TGAT 204

40

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 7:

(1) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:SEQ ID NO: 7:

- 45 (A) LONGUEUR:32 paires de bases
 (B) TYPE: acide nucléique
 (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 (D) CONFIGURATION: linéaire

50

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: NON

55

(vi) ORIGINE:

(A) ORGANISME: Humain

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 7:

60

GTIATGGAIA AICCITCCCC ICTICTIGTI GG

32

(2) INFORMATION POUR LA SEO ID NO: 8:

5

(1) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:SEQ ID NO: 8:

(A) LONGUEUR: 26 paires de bases

(B) TYPE: acide nucléique

(C) NOMBRE DE BRINS: simple

(D) CONFIGURATION: linéaire

10

(11) TYPE DE MOLECULE: ADNc

15

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: NON

(v1) ORIGINE:

(A) ORGANISME: Humain

20

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 8:

GAATCATCGA AIACIACGAA ICCGAA

26

25

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 9:

30

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 466 acides aminés

(B) TYPE: acide aminé

(C) NOMBRE DE BRINS: simple

(D) CONFIGURATION: linéaire

35

(ii) TYPE DE MOLECULE: peptide

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 9:

40

Met Val Met Glu Lys Pro Ser Pro Leu Leu Val Gly Arg Glu Phe Val
1 5 10 15

Arg Gln Tyr Tyr Thr Leu Leu Asn Gln Ala Pro Asp Met Leu His Arg
20 25 30

45

Phe Tyr Gly Lys Asn Ser Ser Tyr Val His Gly Gly Leu Asp Ser Asn
35 40 45

50

Gly Lys Pro Ala Asp Ala Val Tyr Gly Gln Lys Glu Ile His Arg Lys
50 55 60

Val Met Ser Gln Asn Phe Thr Asn Cys His Thr Lys Ile Arg His Val
65 70 75 80

55

Asp Ala His Ala Thr Leu Asn Asp Gly Val Val Val Gln Val Met Gly
85 90 95

Leu Leu Ser Asn Asn Asn Gln Ala Leu Arg Arg Phe Met Gln Thr Phe
100 105 110

60

Val Leu Ala Pro Glu Gly Ser Val Ala Asn Lys Phe Tyr Val His Asn
115 120 125

21

Asp Ile Arg Tyr Gln Asp Glu Val Phe Gly Gly Phe Val Thr Glu Pro
 130 135 140
 5 Gln Glu Glu Ser Glu Glu Glu Val Glu Glu Pro Glu Glu Arg Gln Gln
 145 150 155 160
 Thr Pro Glu Val Val Pro Asp Asp Ser Gly Thr Phe Tyr Asp Gln Ala
 165 170 175
 10 Val Val Ser Asn Asp Met Glu Glu His Leu Glu Glu Pro Val Ala Glu
 180 185 190
 Pro Glu Pro Asp Pro Glu Pro Glu Pro Glu Gln Glu Pro Val Ser Glu
 195 200 205
 15 Ile Gln Glu Glu Lys Pro Glu Pro Val Leu Glu Glu Thr Ala Pro Glu
 210 215 220
 20 Asp Ala Gln Lys Ser Ser Ser Pro Ala Pro Ala Asp Ile Ala Gln Thr
 225 230 235 240
 Val Gln Glu Asp Leu Arg Thr Phe Ser Trp Ala Ser Val Thr Ser Lys
 245 250 255
 25 Asn Leu Pro Pro Ser Gly Ala Val Pro Val Thr Gly Ile Pro Pro His
 260 265 270
 Val Val Lys Val Pro Ala Ser Gln Pro Arg Pro Glu Ser Lys Pro Glu
 275 280 285
 30 Ser Gln Ile Pro Pro Gln Arg Pro Gln Arg Asp Gln Arg Val Arg Glu
 290 295 300
 35 Gln Arg Ile Asn Ile Pro Pro Gln Arg Gly Pro Arg Pro Ile Arg Glu
 305 310 315 320
 Ala Gly Glu Gln Gly Asp Ile Glu Pro Arg Arg Met Val Arg His Pro
 325 330 335
 40 Asp Ser His Gln Leu Phe Ile Gly Asn Leu Pro His Glu Val Asp Lys
 340 345 350
 Ser Glu Leu Lys Asp Phe Phe Gln Ser Tyr Gly Asn Val Val Glu Leu
 355 360 365
 45 Arg Ile Asn Ser Gly Gly Lys Leu Pro Asn Phe Gly Phe Val Val Phe
 370 375 380
 50 Asp Asp Ser Glu Pro Val Gln Lys Val Leu Ser Asn Arg Pro Ile Met
 385 390 395 400
 Phe Arg Gly Glu Val Arg Leu Asn Val Glu Glu Lys Lys Thr Arg Ala
 405 410 415
 55 Ala Arg Glu Gly Asp Arg Arg Asp Asn Arg Leu Arg Gly Pro Gly Gly
 420 425 430
 Pro Arg Gly Gly Leu Gly Gly Gly Met Arg Gly Pro Pro Arg Gly Gly
 435 440 445
 60 Met Val Gln Lys Pro Gly Phe Gly Val Gly Arg Gly Leu Ala Pro Arg
 450 455 460

Gln Glx
465

5 (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 10:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 (A) LONGUEUR: 2129 paires de bases
 (B) TYPE: nucléotide
 10 (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

15 (iii) HYPOTHETIQUE: NON

20 (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 10:

	GCTTGCTGT CAGGTCGACT CTAGAGCCCG GGTACCGAGC TCGAATTCGG CGGGGTTTGT	60
	ACTATCCTCG GTGCTGTGGT GCAGAGCTAG TTCCTCTCCA GCTCAGCCGC GTAGGTTTGG	120
25	ACATATTTAC TCTTTTCCCC CCAGGTTGAA TTGACCAAAG CAATGGTGAT GGAGAAGCCT	180
	AGTCCCCTGC TGGTCGGGCG GGAATTTGTG AGACAGTATT ACACACTGCT GAACCAGGCC	240
30	CCAGACATGC TGCATAGATT TTATGGAAAG AACTCTTCTT ATGTCCATGG GGGATTGGAT	300
	TCAAATGGAA AGCCAGCAGA TGCAGTCTAC GGACAGAAAG AAATCCACAG GAAAGTGATG	360
35	TCACAAACT TCACCAACTG CCACACCAAG ATTCGCCATG TTGATGCTCA TGCCACGCTA	420
	AATGATGGTG TGGTAGTCCA GGTGATGGGG CTTCTCTCTA ACAACAACCA GGCTTTGAGG	480
	AGATTCATGC AAACGTTTGT CCTTGCTCCT GAGGGGTCTG TTGCAAATAA ATTCTATGTT	540
40	CACAATGATA TCTTCAGATA CCAAGATGAG GTCTTTGGTG GGTTTGTCAC TGAGCCTCAG	600
	GAGGAGTCTG AAGAAGAAGT AGAGGAACCT GAAGAAAGCA GCAAACACCT GAGGTGGTAC	660
45	CTGATGATTC TGGAAC TTC TATGATCAGG CAGTTGTCAG TAATGACATG GAAGAACATT	720
	TAGAGGAGCC TGTGCTGAA CCAGAGCCTG ATCCTGAACC AGAACCAGAA CAAGAACCTG	780
	TATCTGAAAT CCAAGAGGAA AAGCCTGAGC CAGTATTAGA AGAACTGCC CCTGAGGATG	840
50	CTCAGAAGAG TTCTTCTCCA GCACCTGCAG ACATAGCTCA GACAGTACAG GAAGACTTGA	900
	GGACATTTTC TTGGGCATCT GTGACCAGTA AGAATCTTCC ACCCAGTGGA GCTGTTCCAG	960
55	TTACTGGGAT ACCACCTCAT GTTGTTAAAG TACCAGCTTC ACAGCCCCGT CCAGAGTCTA	1020
	AGCCTGAATC TCAGATTCCA CCACAAAGAC CTCAGCGGGA TCAAAGAGTG CGAGAACAAC	1080
	GAATAAATAT TCCTCCCCAA AGGGGACCCA GACCAATCCG TGAGGCTGGT GAGCAAGGTG	1140
60	ACATTGAACC CCGAAGAATG GTGAGACACC CTGACAGTCA CCAACTCTTC ATTGGCAACC	1200
	TGCCTCATGA AGTGGACAAA TCAGAGCTTA AAGATTTCTT TCAAAGTTAT GGAAACGTGG	1260

	TGGAGTTGCG	CATTAACAGT	GGTGGGAAAT	TACCCAATTT	TGGTTTTGTT	GTGTTTGATG	1320
	ATTCTGAGCC	TGTTTCAGAAA	GTCCTTAGCA	ACAGGCCCAT	CATGTTCAGA	GGTGAGGTCC	1380
5	GTCTGAATGT	CGAAGAGAAG	AAGACTCGAG	CTGCCAGGGA	AGGCGACCGA	CGAGATAATC	1440
	GCCTTCGGGG	ACCTGGAGGC	CCTCGAGGTG	GGCTGGGTGG	TGGAATGAGA	GGCCCTCCCC	1500
	GTGGAGGCAT	GGTGCAGAAA	CCAGGATTTG	GAGTGGGAAG	GGGGCTTGCG	CCACGGCAGT	1560
10	AATCTTCATG	GATCTTCATG	CAGCCATACA	AACCCTGGTT	CCAACAGAAT	GGTGAATTTT	1620
	CGACAGCCTT	TGGTATCTTG	GAGTATGACC	CCAGTCTGTT	ATAAACTGCT	TAAGTTTGTA	1680
15	TAATTTTACT	TTTTTTGTGT	GTTAATGGTG	TGTGCTCCCT	CTCCCTCTCT	TCCCTTTCCT	1740
	GACCTTTAGT	CTTTCACCTC	CAATTTTGTG	GAATGATATT	TTAGGAATAA	CGGACTTTTA	1800
	CCCGAATTCG	TAATCATGGT	CATAGCTGTT	TCCGTGTGAA	ATTGTTATCC	GCTCACAATT	1860
20	CCACACAACA	TACGAGCCGG	AAGCATAAAG	TGTAAAGCCT	GGGGTGCCTA	ATGAGTGAGC	1920
	TAACTCACAT	TAATTGCGTT	GCGCTCACTG	CCCGCTTTCC	AGTCGGGAAA	CCTGTCGTGC	1980
25	CAGCGCATT	ATGAATCGGC	CAACGCGCGG	GGAGAGGCGG	TTTGCGTATT	GGGCGCCAGG	2040
	GTGGTTTCT	TTTCACCAGT	GAGACGGGCA	ACAGCTGATT	GCCCTTCACC	GCTGGCCCTG	2100
30	AGAGAGTTGC	AGCAAGCGGT	CCACGCTGG				2129

REVENDEICATIONS

1. Polypeptide capable d'interagir avec le domaine SH3 de la protéine GAP caractérisé en ce qu'il comprend tout ou partie d'une séquence peptidique choisie
5 parmi les séquences SEQ ID N°1, SEQ ID N°2, SEQ ID N°3, SEQ ID N°4, SEQ IDN°5, SEQ ID N°9 ou d'un dérivé de celles-ci.
2. Polypeptide selon l'une des revendications précédentes caractérisé en ce qu'il comprend la SEQ ID N°1, SEQ ID N°2, SEQ ID N°3 et/ou SEQ ID N°4.
3. Polypeptide selon l'une des revendications précédentes caractérisé en ce
10 qu'il possède un poids moléculaire de l'ordre de 68kDa.
4. Polypeptide selon la revendication 1 ou 3 caractérisé en ce qu'il est d'origine humaine.
5. Polypeptide selon la revendication 4 caractérisé en ce qu'il comprend tout ou partie de la séquence SEQ ID N°5, SEQ ID N°9 ou d'un dérivé de celles-ci.
15
6. Polypeptide selon la revendication 1, 4 ou 5 caractérisé en ce qu'il est représenté par la SEQ ID N°9 ou l'un de ses dérivés.
7. Polypeptide selon l'une des revendications précédentes caractérisé en que
20 ses motifs tyrosine ne se phosphorylent pas dans des cellules mitotiques ou en croissance.
8. Anticorps ou fragment d'anticorps dirigé contre un polypeptide selon l'une des revendications 1 à 7.
9. Anticorps ou fragment d'anticorps selon la revendication 8 caractérisé en
ce qu'il est dirigé contre une séquence choisie parmi les séquences peptidiques
25 présentées en SEQ ID N°1, SEQ ID N°2, SEQ ID N°3 , SEQ ID N°4, SEQ ID N°5, SEQ ID N°9.

10. Anticorps ou fragment d'anticorps selon la revendication 8 ou 9 caractérisé en ce qu'il possède la faculté d'inhiber l'interaction entre la protéine GAP et un polypeptide selon l'une des revendications 1 à 7.

11. Séquence nucléotidique codant pour un polypeptide tel que défini selon
5 l'une des revendications 1 à 7.

12. Séquence nucléotidique selon la revendication 11 caractérisée en ce qu'elle comprend :

- (a) tout ou partie de la séquence SEQ ID N°6, SEQ ID N°10 ou de leurs brins complémentaires,
- 10 (b) toute séquence hybridant avec la séquence (a) et codant pour un polypeptide selon l'invention, et
- (c) les séquences dérivées des séquences (a) et (b) en raison de la dégénérescence du code génétique.

13. Séquence nucléotidique selon la revendication 11 ou 12 caractérisée en ce
15 qu'elle comprend la séquence SEQ ID N°6.

14. Séquence nucléotidique selon la revendication 11, 12 ou 13 caractérisée en ce qu'elle est représentée en SEQ ID N°10

15. Acide nucléique antisens capable d'inhiber au moins partiellement la production de polypeptides selon l'une des revendications 1 à 7.

20 16. Utilisation d'une séquence selon l'une des revendications 11 à 14 pour la détection de l'expression d'un polypeptide selon l'une des revendications 1 à 7 ou pour la mise en évidence d'anomalies génétiques (mauvais épissage, polymorphisme, mutations ponctuelles, etc).

25 17. Utilisation d'un polypeptide selon l'une des revendications 1 à 7 pour la réalisation d'un composé non peptidique ou non exclusivement peptidique capable d'interagir avec la protéine GAP, par détermination des éléments structuraux de ce polypeptide qui sont importants pour son activité et reproduction de ces éléments par des structures non peptidiques ou non exclusivement peptidiques.

30 18. Composition pharmaceutique comprenant comme principe actif au moins un polypeptide selon l'une des revendications 1 à 7 et/ou un anticorps ou fragment

d'anticorps selon la revendication 8 à 10 et/ou un acide nucléique antisens selon la revendication 15 et/ou un composé préparé selon la revendication 17.

19. Composition pharmaceutique selon la revendication 18 destinée à moduler l'activation des protéines p21.

5 20. Composition pharmaceutique selon la revendication 18 destinée au traitement des cancers.

10 21. Utilisation d'un anticorps ou fragment d'anticorps selon la revendication 10 et/ou d'une séquence nucléotidique selon la revendication 11 pour la détection de l'expression et/ou d'une surexpression d'un polypeptide selon l'une des revendications 1 à 7 amplifié, muté ou réarrangé dans un échantillon biologique.

22. Utilisation d'un anticorps ou fragment d'anticorps selon l'une des revendications 8 à 10 et/ou d'une séquence nucléotidique selon l'une des revendications 11 à 13 pour le typage de cancers ou de maladies liées à des défauts de signalisation.

15 23. Utilisation d'une séquence nucléotidique ARN ou ADN capable d'interagir avec un polypeptide selon l'une des revendications 1 à 7.

24. Utilisation d'un polypeptide tel que défini en revendications 1 à 7 pour interférer avec les signaux transduits par les produits des gènes Ras.

1/2

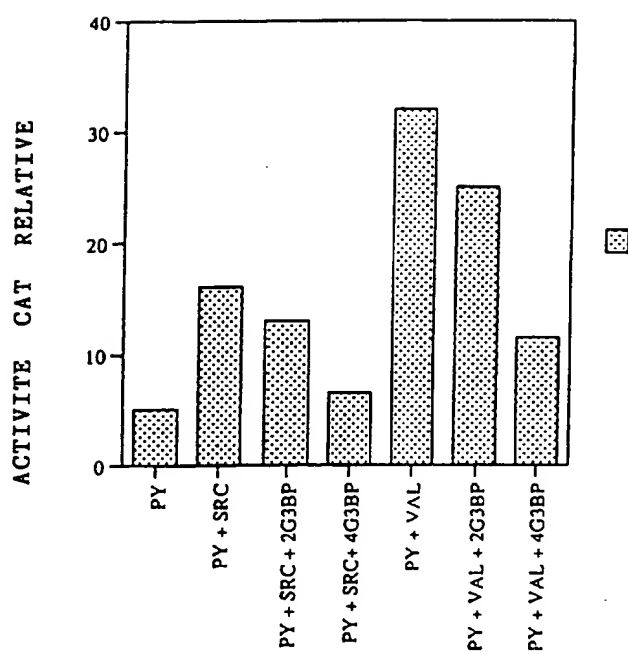


Figure 1

2/2

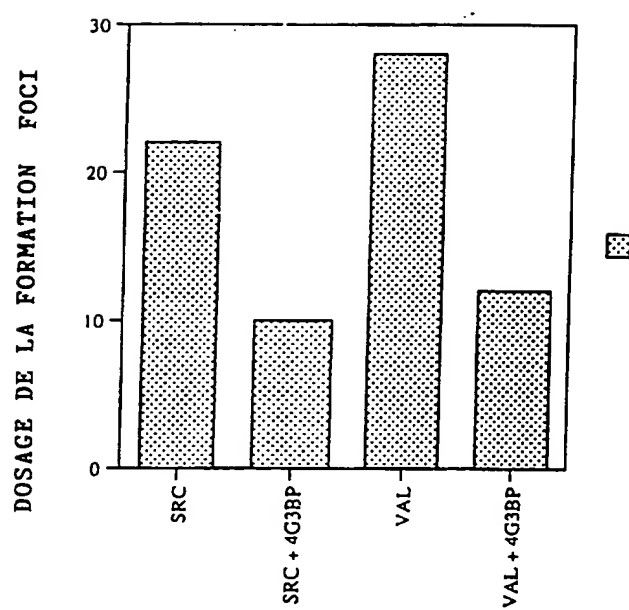


Figure 2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

national Application No

PCT/FR 95/01539

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 C12N15/12 C07K14/47 A61K39/395 C12Q1/68 A61K38/17
G01N33/53

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C07K C12N C12Q G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	FR,A,2 694 296 (RHONE-POULENC RORER) 4 February 1994 see the whole document ---	1,8,10, 11,15, 16,18-23
A	IMMUNOBIOLOGY, vol. 191, no. 2-3, September 1994 pages 128-129, JANSSEN ET AL. 'SH3 binding of GAP-associated p62 : linking protein tyrosine kinases and ras activation in T cells' see the whole document --- -/--	1,7,8

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

T later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

X document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

Y document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

A document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

12 March 1996

Date of mailing of the international search report

26. 03. 96

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl
Fax (+ 31-70) 340-3016

Authorized officer

Gac, G

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/FR 95/01539

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	SCIENCE, vol. 259, no. 5894, 22 January 1993 pages 525-528, DUCHESNE ET AL. 'Identification of the SH3 domain of GAP as an essential sequence for ras-GAP mediated signaling' see the whole document ---	1,24
A	EMBO J., vol. 13, no. 6, 15 March 1994 pages 1270-1279, YANG ET AL. 'Solution structure of GAP SH3 domain by 1H NMR and spacial arrangement of essential ras signaling involved sequence' see the whole document ---	1,24
X	NATURE, vol. 365, no. 6443, 16 September 1993 pages 269-274, PARK ET AL. 'BUD2 encodes a GTPase-activating protein for Bud1/Rsr1 necessary for proper bud-site selection in yeast' see the sequence ---	1
A	J. BIOL. CHEM., vol. 268, no. 35, 15 December 1993 pages 26059-26062, BARFOD ET AL. 'Cloning and expression of a human CDC42 GTPase-activating protein reveals a functional SH3-binding domain' see the whole document ---	1
A	MOL. CELL. BIOL., vol. 12, no. 8, August 1992 pages 3425-3430, MEDEMA ET AL. 'GTPase-activating protein SH2-SH3 domains induce gene expression in a ras-dependent fashion' see the whole document ---	1,11, 18-20, 22,23
A	MOL. CELL. BIOL., vol. 12, no. 4, 1992 pages 1835-1845, SEIDEL-DUGAN ET AL. 'Effects of SH2 and SH3 deletions on the functional activities of wild-type and transforming variants of c-src' see the whole document ---	1,3,7,8, 10,11,21
A	WO,A.91 02749 (CETUS CORPORATION) 7 March 1991 see page 29 - page 30 ---	1-24
	--- -/--	

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/FR 95/01539

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO,A,94 16069 (SHERING CORPORETION) 21 July 1994 see page 10 see page 12 ---	1-24
A	EP,A,0 496 162 (MERCK & CO INC.) 29 July 1992 see the whole document ---	1-24
A	DATABASE STRAND ID= EMST : HSC0FH021; AN: Z42330, 5 November 1994 * see sequence * & C. R. ACAD. SCI. III, SCI. VIE, vol. 318, 1995 pages 263-272, AUFFRAY ET AL. 'IMAGE : intégration au niveau moléculaire de l'analyse du génome humain et de son expression' -----	1,5,6,14

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

national Application No

PCT/FR 95/01539

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
FR-A-2694296	04-02-94	CA-A- 2141061 EP-A- 0652952 WO-A- 9403597 JP-T- 7509609	17-02-94 17-05-95 17-02-94 26-10-95
WO-A-9102749	07-03-91	AU-B- 652724 AU-B- 6424790 AU-B- 8034694 CA-A- 2065017 EP-A- 0491828 JP-T- 5500506	08-09-94 03-04-91 16-02-95 22-02-91 01-07-92 04-02-93
WO-A-9416069	21-07-94	AU-B- 6083894 CA-A- 2153486 EP-A- 0679185	15-08-94 21-07-94 02-11-95
EP-A-496162	29-07-92	CA-A- 2057675 JP-A- 5178894	25-06-92 20-07-93

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

mande internationale No

PCT/FR 95/01539

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
CIB 6 C12N15/12 C07K14/47
G01N33/53

A61K39/395 C12Q1/68 A61K38/17

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 6 C07K C12N C12Q G01N

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	FR,A,2 694 296 (RHONE-POULENC RORER) 4 Février 1994 voir le document en entier ---	1,8,10, 11,15, 16,18-23
A	IMMUNOBIOLOGY, vol. 191, no. 2-3, Septembre 1994 pages 128-129, JANSSEN ET AL. 'SH3 binding of GAP-associated p62 : linking protein tyrosine kinases and ras activation in T cells' voir le document en entier --- -/--	1,7,8

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

- *A* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- *E* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- *L* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- *O* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- *P* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

T document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

- *X* document particulièrement pertinent l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- *Y* document particulièrement pertinent l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- *Z* document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

12 Mars 1996

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

26.03.96

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tél. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Gac, G

C.(note) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	SCIENCE, vol. 259, no. 5094, 22 Janvier 1993 pages 525-528, DUCHESNE ET AL. 'Identification of the SH3 domain of GAP as an essential sequence for ras-GAP mediated signaling' voir le document en entier ---	1,24
A	EMBO J., vol. 13, no. 6, 15 Mars 1994 pages 1270-1279, YANG ET AL. 'Solution structure of GAP SH3 domain by 1H NMR and spacial arrangement of essential ras signaling involved sequence' voir le document en entier ---	1,24
X	NATURE, vol. 365, no. 6443, 16 Septembre 1993 pages 269-274, PARK ET AL. 'BUD2 encodes a GTPase-activating protein for Bud1/Rsr1 necessary for proper bud-site selection in yeast' voir la séquence. ---	1
A	J. BIOL. CHEM., vol. 268, no. 35, 15 Décembre 1993 pages 26059-26062, BARFOD ET AL. 'Cloning and expression of a human CDC42 GTPase-activating protein reveals a functional SH3-binding domain' voir le document en entier ---	1
A	MOL. CELL. BIOL., vol. 12, no. 8, Août 1992 pages 3425-3430, MEDEMA ET AL. 'GTPase-activating protein SH2-SH3 domains induce gene expression in a ras-dependent fashion' voir le document en entier ---	1,11, 18-20, 22,23
A	MOL. CELL. BIOL., vol. 12, no. 4, 1992 pages 1835-1845, SEIDEL-DUGAN ET AL. 'Effects of SH2 and SH3 deletions on the functional activities of wild-type and transforming variants of c-src' voir le document en entier ---	1,3,7,8, 10,11,21
A	WO,A,91 02749 (CETUS CORPORATION) 7 Mars 1991 voir page 29 - page 30 ---	1-24

-/--

Formulaire PCT/ISA/218 (suite de la description (bulletin)) (juillet 1992)

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

bande internationale No

PCT/FR 95/01539

C.(note) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	WO,A,94 16869 (SHERING CORPORETION) 21 Juillet 1994 voir page 10 voir page 12 ---	1-24
A	EP,A,0 496 162 (MERCK & CO INC.) 29 Juillet 1992 voir le document en entier ---	1-24
A	DATABASE STRAND ID= EMST : HSC0FH021; AN: Z42330, 5 Novembre 1994 * voir séquence * & C. R. ACAD. SCI. III, SCI. VIE, vol. 318, 1995 pages 263-272, AUFFRAY ET AL. 'IMAGE : intégration au niveau moléculaire de l'analyse du génome humain et de son expression' -----	1,5,6,14

Formulaire PCT/ISA/218 (suite de la deuxième feuille) (juillet 1992)

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

mandat internationale No

PCT/FR 95/01539

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
FR-A-2694296	04-02-94	CA-A- 2141061	17-02-94
		EP-A- 0652952	17-05-95
		WO-A- 9403597	17-02-94
		JP-T- 7509609	26-10-95
WO-A-9102749	07-03-91	AU-B- 652724	08-09-94
		AU-B- 6424790	03-04-91
		AU-B- 8034694	16-02-95
		CA-A- 2065017	22-02-91
		EP-A- 0491828	01-07-92
		JP-T- 5500506	04-02-93
WO-A-9416069	21-07-94	AU-B- 6083894	15-08-94
		CA-A- 2153486	21-07-94
		EP-A- 0679185	02-11-95
EP-A-496162	29-07-92	CA-A- 2057675	25-06-92
		JP-A- 5178894	20-07-93